

CRISPR-Cas Systems RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea

CRISPR-Cas

——RNA介导的细菌和古细菌中适应性免疫系统

[美] 鲁道夫·巴兰古 (Rodolphe Barrangou) 主编
[荷] 约翰·范德奥斯特 (John van der Oost)

李南生 译



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

CRISPR-Cas Systems RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria
and Archaea

CRISPR-Cas

——RNA 介导的细菌和古细菌中 适应性免疫系统

[美] 鲁道夫·巴兰古(Rodolphe Barrangou)

[荷] 约翰·范德奥斯特(John van der Oost)

主编

李南生 译



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

内 容 提 要

本书对近年来发现的存在于细菌和古细菌中的适应性免疫系统—CRISPR 系统进行了全视角系统阐释。描述了 CRISPR-Cas 系统的整体变异性、多样性特征,以及利用这种变异性描绘菌种之间的系统发育关系。通过对 CRISPR-Cas 系统中 cas 基因组进行比较分析,提供了不同 CRISPR-Cas 类型(I, II 和 III 型)的级联复合物结构的精细模型。讨论了基于 CRISPR 免疫应答的调控机制和 CRISPR-Cas 系统防御侵袭基因组关键要素 crRNA 的生物合成机制。阐释了 CRISPR-Cas 的细菌细胞毒性作用以及在不同工业和生物技术、基因组编辑等领域的多种应用。最后阐明了 CRISPR 作用机制的分子基础和微生物群落背景下的 CRISPRs 系统。

本书适合生命科学、医学、环境科学、食品加工、农业和畜牧(渔)业等相关专业领域的人士阅读,特别是对应用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术的相关科研领域的研究人员有极高的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

CRISPR-Cas:RNA 介导的细菌和古细菌中适应性免疫系统 / (美)鲁道夫·巴兰古(Rodolphe Barrangou), (荷)约翰·范德奥斯特(John van der Oost)主编;李南生译. —上海:同济大学出版社,2018.7

书名原文:CRISPR-Cas Systems RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea

ISBN 978-7-5608-7766-2

I. ①C… II. ①鲁… ②约… ③李… III. ①细菌—分子生物学—研究 IV. ①Q939.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 046777 号

CRISPR-Cas——RNA 介导的细菌和古细菌中适应性免疫系统

[美]鲁道夫·巴兰古(Rodolphe Barrangou) 主编 李南生 译

[荷]约翰·范德奥斯特(John van der Oost) 封面设计 陈益平

责任编辑 马继兰 责任校对 徐春莲

出版发行 同济大学出版社 www.tongjipress.com.cn
(地址:上海市四平路 1239 号 邮编:200092 电话:021-65985622)

经 销 全国各地新华书店

排 版 南京月叶图文制作有限公司

印 刷 上海安兴汇东纸业纸业有限公司

开 本 787 mm×1 092 mm 1/16

印 张 21.5

字 数 430 000

版 次 2018 年 7 月第 1 版 2018 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5608-7766-2

定 价 88.00 元

本书若有印装质量问题,请向本社发行部调换 版权所有 侵权必究

序^①

本书 2013 年版序言的最后一句话——这可能只是个开始……预言 CRISPR 领域发展的乐观看法现在被证实是完全正确的,但也显得有些轻描淡写。事实上,自 2013 年以来,没有人能够完全精准地预测 CRISPR 所引发的革命性科技进步。虽然从 2005—2012 年这些年应被视为 CRISPR 领域研究的初期,但这些年开展的研究工作打下的基础,开启了一个新的时代,这是通过改造基于 CRISPR 分子机制的技术所推动的。在这些早期的研究中,关于 CRISPR 系统的基础性发现促使我们对这个适应性免疫系统的机制,特别是对与 CRISPR 相关核酸酶的分子机制有了深入了解。这一切都始于对 CRISPR 序列进行的基因组学分析和比较研究,这些研究导致预测出一种新奇的免疫系统——CRISPR 系统(第 1,2 章)^[1],这种免疫系统广泛存在于微生物群落中(第 9,12 章)^[2],大约一半的细菌和几乎所有的古细菌基因组中携带各种不同类型的 CRISPR-Cas 系统(第 3 章)^[2]。此后不久,通过在 CRISPR-Cas 系统中获得表达特定蛋白的间隔区基因,提供了可遗传的适应性免疫系统的实验证据(第 7 章)^[3]。在所有 CRISPR-Cas 类型和微生物中,控制表达 Cas 蛋白和各种 crRNA 引导的调控和成熟机制千差万别(第 4,5 章)^[4]。在干扰阶段,已经证明 crRNA 引导允许 Cas 核酸酶靶向 DNA(I, II 和 III 型系统;第 6,7,8 章)^[5]或 RNA(III 型,第 8 章)^[6]。除了针对入侵病毒和质粒的免疫作用之外,已经描述 CRISPR-Cas 系统参与细胞内调控机制的几个实例(第 10 章)^[7]。最后但同

① 原著主编 John van der Oost 和 Rodolphe Barrangou 特别为本书中文版撰写的序。

样重要的是,2013年,关于CRISPR-Cas系统的基础生物化学原理的阐述为其一系列应用开辟了新的途径,包括通过引导设计和异源表达实现cas核苷酸的惊人重组,允许对任何生物的任何序列进行精确的基因组编辑(第11章)^[8]。

自2013年初次出版本书以来,基于CRISPR的技术本身正以惊人的速度急剧发展,并在生物学领域引起了真正意义的革命性变化。现已发现新的CRISPR-Cas类型,多亚基级联复合物(现称为2类,I,Ⅲ,Ⅳ型)和多结构域Cas9样蛋白(2类,Ⅱ,V,Ⅵ型)^[9]。将分子遗传学和生物化学新知识与许多Cas蛋白和复合物的高分辨率结构结合起来,揭示了各种CRISPR-Cas系统的重要功能性特征。因此,我们现在已经深入了解CRISPR-Cas机制的所有3个阶段的分子基础:(i)适应(Cas1/Cas2/Cas4),(ii)表达和引导成熟(Cas6),和(iii)干扰,对于1类(I型级联/Cas3复合物,Ⅲ型Cmr/Csm复合物)和2类(Ⅱ型Cas9,V型Cpf1/Cas12,Ⅵ型Cas13型)系统的干扰^[10]。这些新知识在研究专题上产生了许多综合性变化,包括监测和跟踪、基因表达的抑制或激活(CRISPRi/CRISPRa)等应用,以及采用碱基编辑进行下一代精准工程化基因改造^[11]。鉴于本书充分描述了CRISPR领域的早期崛起,近年来出现了许多优秀的关于CRISPR领域的综述文献,为CRISPR领域革命性发展的壮观情景提供了深刻的回顾。然而,尽管很难想象CRISPR领域的未来发展,但目前可能仍然只是个开始,并且我们可以预期未来将会有更多令人惊喜的故事发生……

John van der Oost , May 2018

序中引用的参考资料

- [1] Mojica & Soria (J Mol Evol 2005), Pourcel & Vergnaud (Microbiology 2005), Bolotin & Ehrlich (Microbiology 2005)
- [2] Haft & Nelson (PLoS Comput Biol 2005), Makarova & Koonin (Biol Dir 2006), Makarova & Koonin (Nat Rev Microbiol 2011)
- [3] Barrangou & Horvath (Science 2007)

- [4] Brouns & Van der Oost (Science 2008), Pul & Wagner (Mol Microbiol 2010), Westra & Brouns (Mol Microbiol 2010), Delcheva & Charpentier (Nature 2011)
- [5] Brouns & Van der Oost (Science 2008), Marraffini & Sonthheimer (Science 2008), Garneau & Moineau (Nature 2010)
- [6] Hale & Terns (Science 2009)
- [7] Zegans & O'Toole (J Bacteriol 2009)
- [8] Brouns & Van der Oost (Science 2008)
- [9] reviews; Makarova & Koonin (Nat Rev Microbiol 2015), Shmakov & Koonin (Nat Rev Microbiol 2017); Charpentier & Doudna (Science 2016), Hsu & Zhang (Cell 2015), Barrangou & Doudna (Nat Biotechnol 2016), Mohanraju & Van der Oost (Science 2016), Wright & Doudna (Cell 2016)
- [10] reviews; Barrangou & Horvath (Nat Microbiol 2017, Science 2008), Sapranasauskas & Siksnys (EMBO J 2011), Jinek & Charpentier (Science 2012), Gasiunas & Siksnys (Proc Natl Acad Sci 2012), Hale & Terns (Mol Cell 2012), Cong & Zhang (Science 2013), Mali & Church (Science 2013), Jinek & Doudna (eLife 2013), Cho & Kim (Nat Biotechnol 2013)
- [11] reviews; Hsu & Zhang (Cell 2015), Wu & Van der Oost (Nat Chem Biol 2018)

原著前言

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, 规律成簇的间隔短回文重复序列)连同相关序列(cas 基因和 Cas 蛋白)形成 CRISPR-Cas 适应性免疫系统,这种适应性免疫系统存在于大部分古细菌和近半细菌中。1987 年首次发现这类相对奇特的重复序列家族,在 2002 年明确了它的特征,2005 年它被认为可能与免疫功能有关,并于 2007 年提出它为细菌抵御病毒侵袭提供获得性免疫系统。因此它涉及在许多微生物体内提供针对噬菌体、古细菌病毒和质粒的适应性免疫功能。近几年开发的功能性模式体系为对这些独特而有趣的防御体系进行彻底的科学研究铺平了道路。

目前,尽管 CRISPR 系统具有广泛的序列多样性和基因多态性,基于系统发育和分子作用机制,人们将 CRISPR-Cas 系统分为 3 种类型。对 CRISPR-Cas 系统进行的分类为专业名称修订奠定了基础,同时,在科学术语、表示标准和 CRISPR 介导的免疫作用各阶段的定义方面达成了共识。从机制上讲,CRISPR-Cas 系统通过 3 个主要步骤驱动免疫作用:(1)**获得**,通过摄入外源 DNA 序列并将其整合为新的 CRISPR 间隔区而产生免疫;(2)**表达**,产生 Cas 蛋白并将 CRISPR 编码的转录物加工成小干扰 CRISPR RNAs(crRNAs);(3)**干扰**,通过 crRNA-Cas 核糖核蛋白复合物介导识别同源靶标和进行特异性切割。这种特异性系统将入侵的短 DNA 序列元件整合到(古)细菌染色体中的能力,使适应性免疫功能成为可遗传的。

本书提供了观察这个系统的一些历史性事件和重要发现的独特视角,揭示

了 CRISPR-Cas 系统的功能及其在细菌和古细菌生物学进化中的作用。一旦建立了 CRISPR 的形成、多样性、功能和进化的机制,每个 CRISPR-Cas 类型都可以被特异地表征出来。本书讨论了 CRISPR-Cas 系统在各种生物过程中的作用(不仅限于防御),同时概述了这个系统的各项应用。探讨 CRISPR-Cas 系统对微生物种群繁衍和进化的影响,为更深入地了解 CRISPR-Cas 系统奠定了基础。

尽管 CRISPR 介导的免疫和 RNA 干扰(RNAi)之间在机制上存在某些共同点,特别是非编码小 RNA 介导的核糖核蛋白复合物切割互补靶核酸序列(靶核酸除了在一种亚型中为 RNA 外,其余一般都是 DNA),但在驱动这两种切割现象的分子机制方面存在根本差异。在功能上,除了提供针对外源病毒和质粒 dsDNA 的适应性免疫外,至少一些 CRISPR-Cas 系统似乎还在宿主调控过程中起作用。已经建立了 CRISPR 系统的几个应用,特别是在增强噬菌体抗性方面的应用,并利用 CRISPR 系统的高变性进行菌种分型和流行病学调查。此外,对链切割机器进行的重编程能够为定制 DNA 限制性、产生链切口、基因组工程和基因编辑开辟了新的途径。

本书作者已经研究 CRISPR 序列多年,并提供了他们对这个快速发展和令人兴奋领域的大量个人观点。同样,本书的几位作者是 CRISPR 研究界非常活跃的成员,并有幸参加了自 2008 年以来在加利福尼亚大学伯克利分校和 2010 年在(荷兰)瓦赫宁根大学举办的历届年度 CRISPR 会议。书中介绍的材料说明了过去五年来该领域发展的狂热步伐,所讨论主题的广度和领域反映出聚集在一起的多元化科学团体成员所涉及的学科范围,涵盖了分子研究、遗传分析、数学建模、进化、功能实现、流行病学、宏基因组学和生态学。研究人员进入这个领域的不同方式,以及涉及这个领域的不同学科方向所具有的各自优势,显示出了这个主题各方面的相互关联性。目前,通过将 CRISPR-Cas 系统用于乳品发酵剂中研发抗噬菌体系统的实践表明,CRISPR 可以在工业上得到应用。对致病菌种中 CRISPR 多态性的分析将确定这些基因座对于流行病学调查、临床分析和食品安全性的相关性。

我们要感谢所有作者^①、合作者和 CRISPR 会议参与者对本领域所做出的贡献,以及他们提出的丰富多彩的意见和相互之间所进行的深刻而又富有远见的交流。

回想起来,在研究 CRISPR 作用机制方面所取得的重大进展,为其实际应用和在不同领域的研究创造了条件,也为今后揭示 CRISPR 的无穷奥秘和解决其尚未解答的疑问奠定了坚实基础。我们希望能够满足广大研究人员对适当的生物信息学工具的需求,NCBI^② 将为此整合 CRISPR 的相关资源。毫无疑问,可以预言,研究团体成员之间的友好合作和在科学研究方面的多样性,将为 CRISPR 作为一个科研领域的光明未来铺平道路。当然,随着 CRISPR 相关出版物数量的不断增加、质量的提高和令人印象深刻的引用率,这个研究领域的未来发展将会一片光明,但现在可能仅仅只是开始……

① 本书一共 34 位作者。

② NCBI(National Center for Biotechnology Information),美国国立生物技术信息中心。

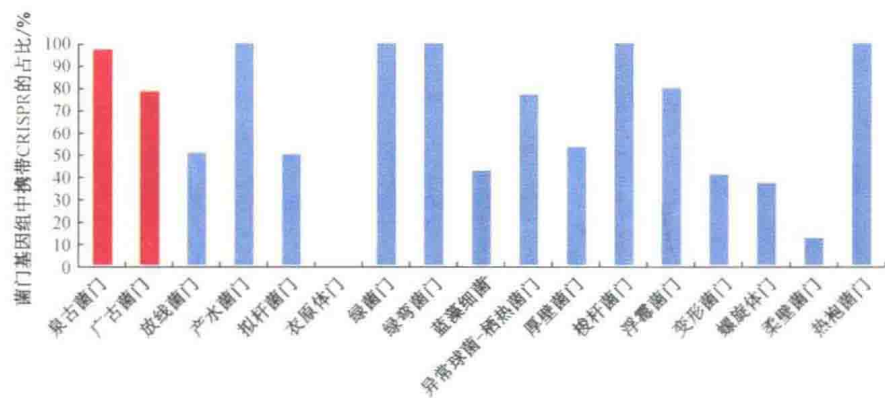


图 1.2

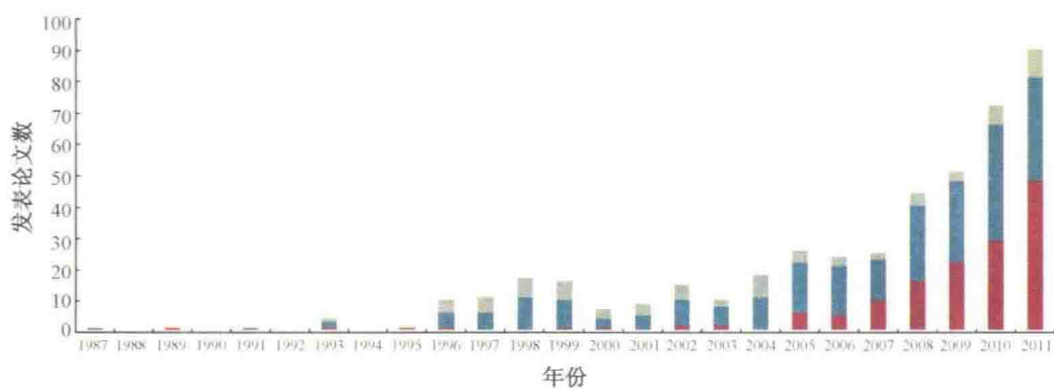


图 1.3

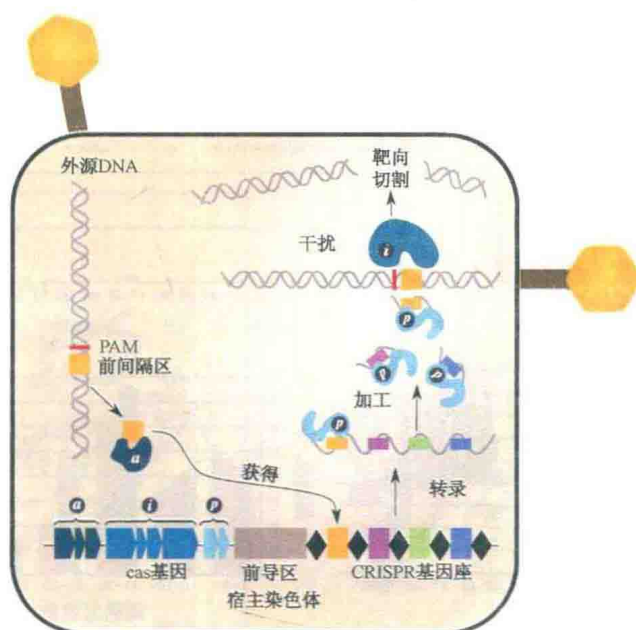


图 1.4

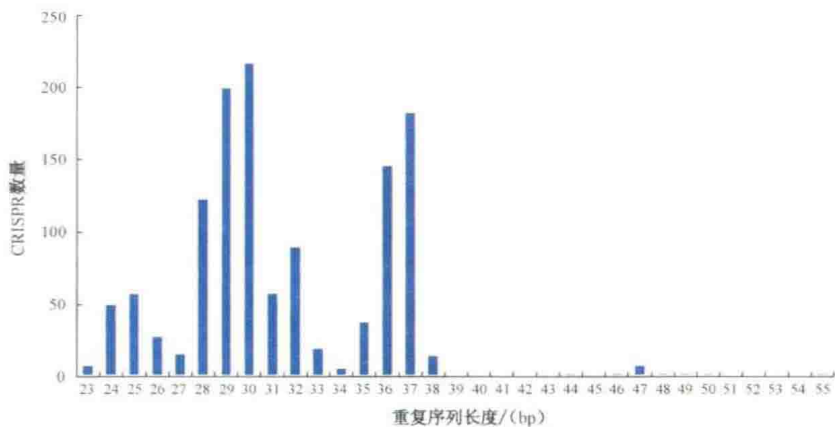


图 1.5

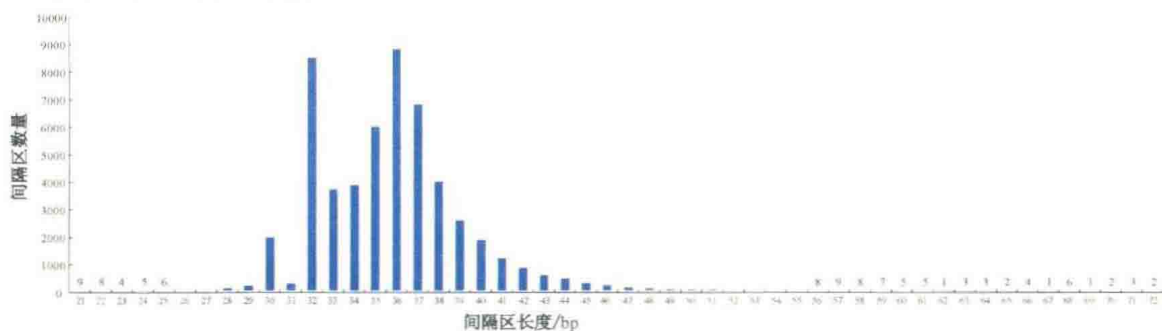


图 1.6

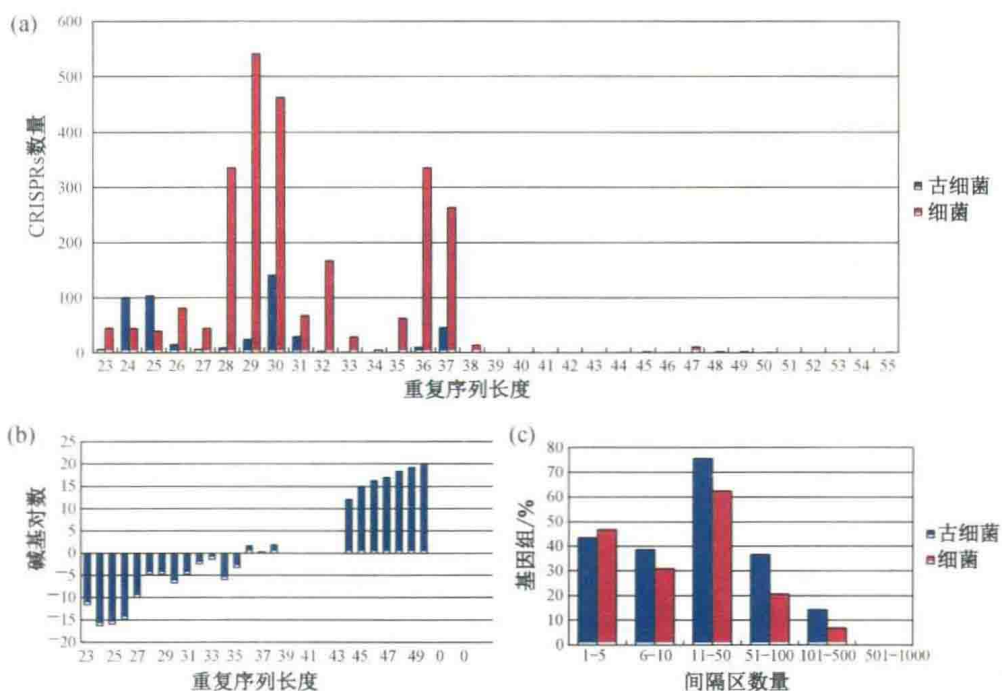


图 2.1

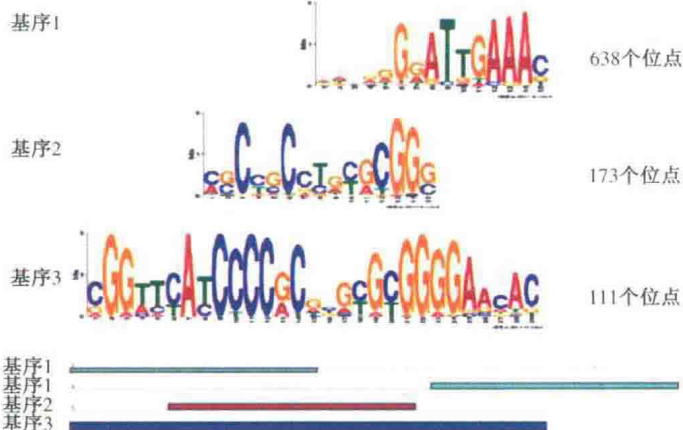


图 2.2

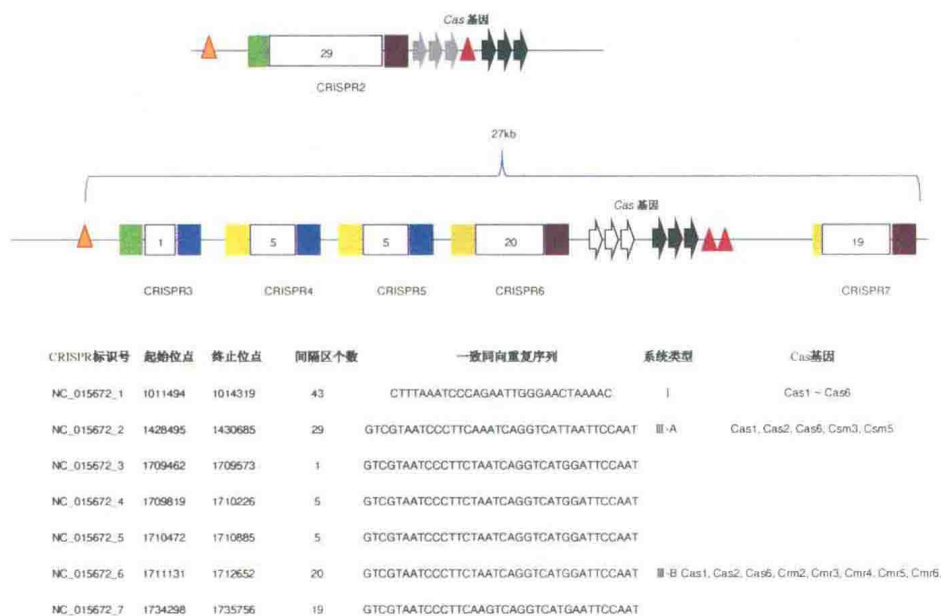


图 2.4

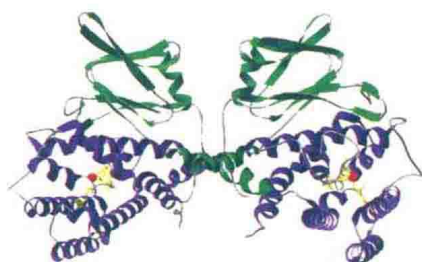


图 3.1

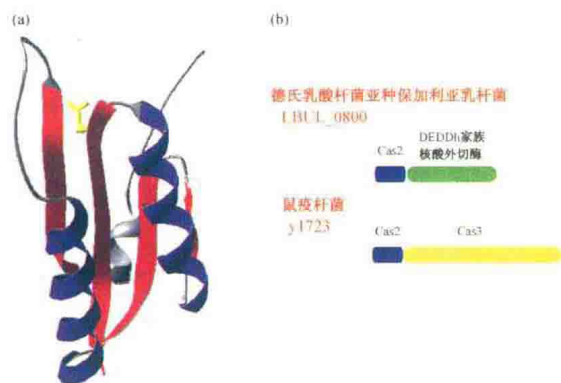


图 3.2

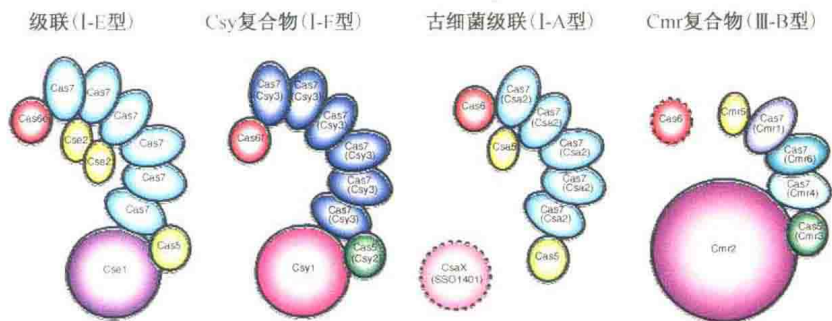


图 3.3

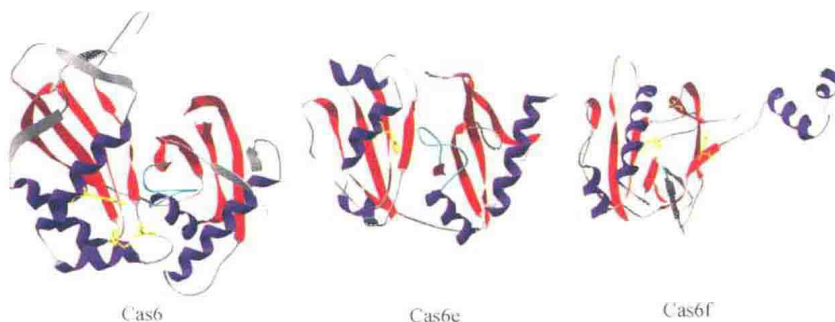


图 3.4

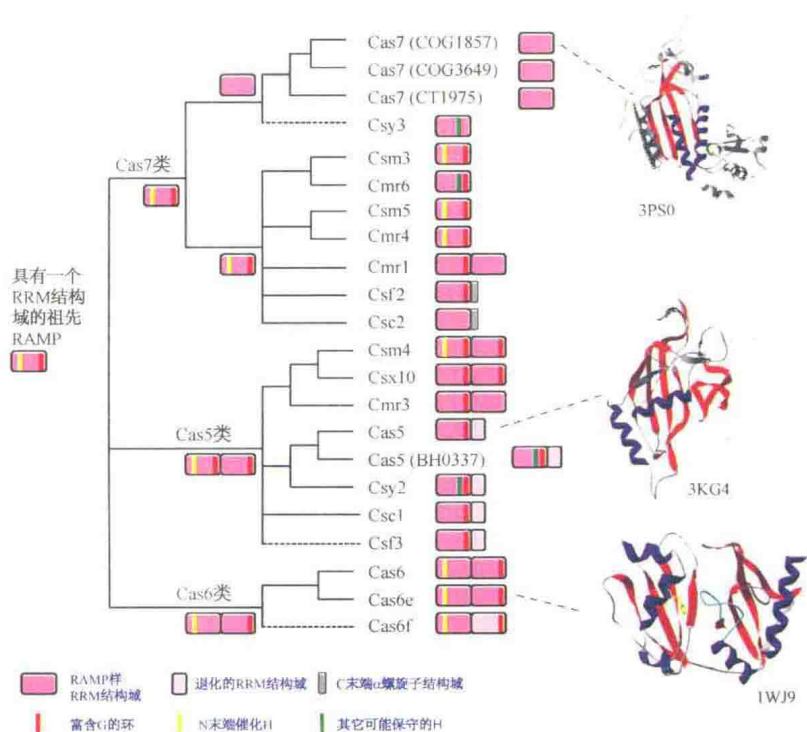
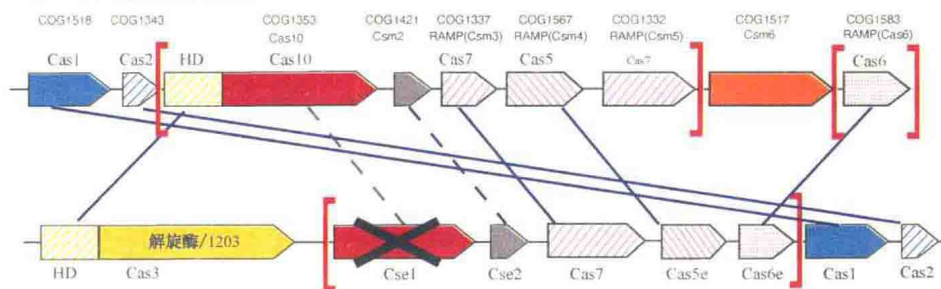


图 3.5

(a) III - A 型 (Mtube/CASS6, 表皮葡萄球菌)



I - E 型 (大肠杆菌 CASS2, 大肠埃希氏杆菌 K12)

(b)

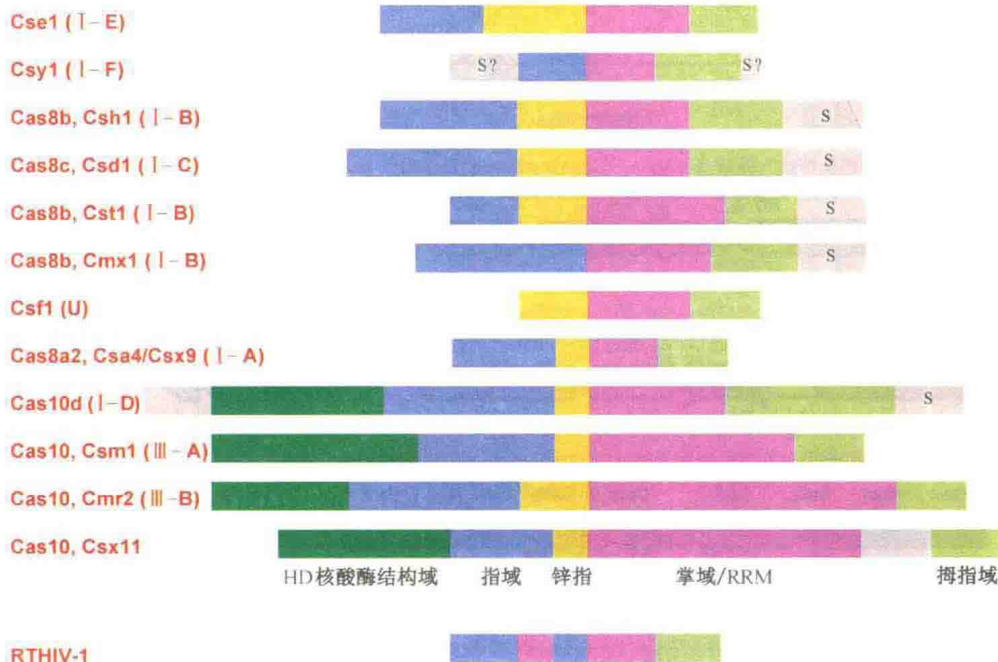


图 3.6

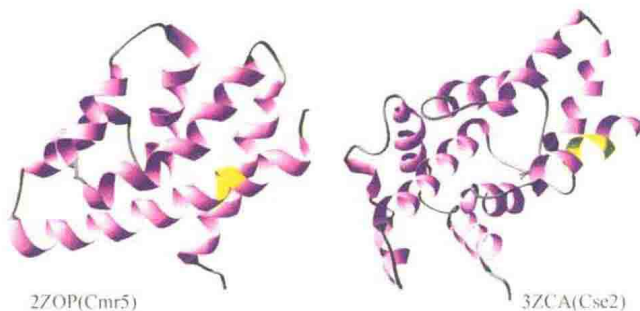


图 3.7

Cas9, Csn1 亚家族



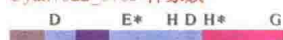
Cas9, Csx12 亚家族



Cyan7822_6324-样家族



Cyan7822_0783-样家族



RuvC样核酸酶区域 (RNaseH折叠)

富含精氨酸区域

Cas9特异性N末端插入片段

HNH家族核酸酶区域

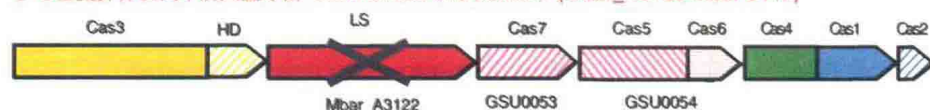
所有4个家族中共有的C-末端区域

Cas9特异性C末端插入片段

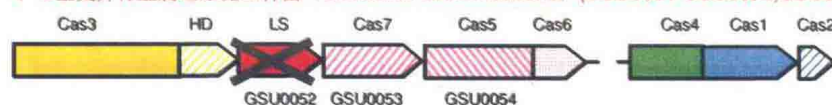
图 3.8

(a)

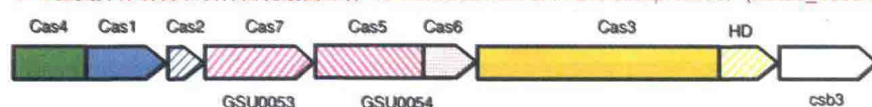
I-C型变异体巴氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina barkeri*) (Mbar_A3123-Mbar_3118)



I-C型变异体金属还原泥土杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*) (GSU0051-GSU0054;GSU0057-GSU0058)

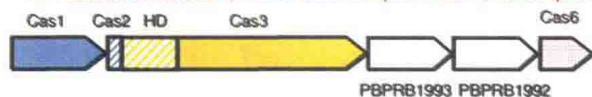


I-C型变异体动物双歧杆菌乳酸菌亚种 (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*) (Balac_1308-Balac_1303)



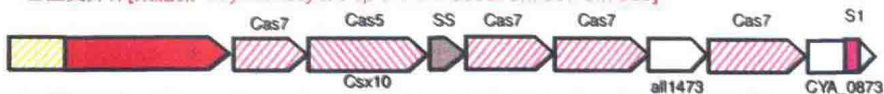
(b)

I-F型变异体发光菌 (*Photobacterium profundum*) S S9 (PBPRB 1995-PBPRB 1991)



(c)

III型变异体[集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803: sli7067-sli7063]



III型变异体[热泉芽胞杆菌 (*Bacillus tusciae*) D SM 2912: Btus_2248-Btus_2244]

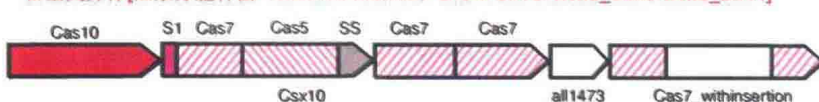


图 3.9

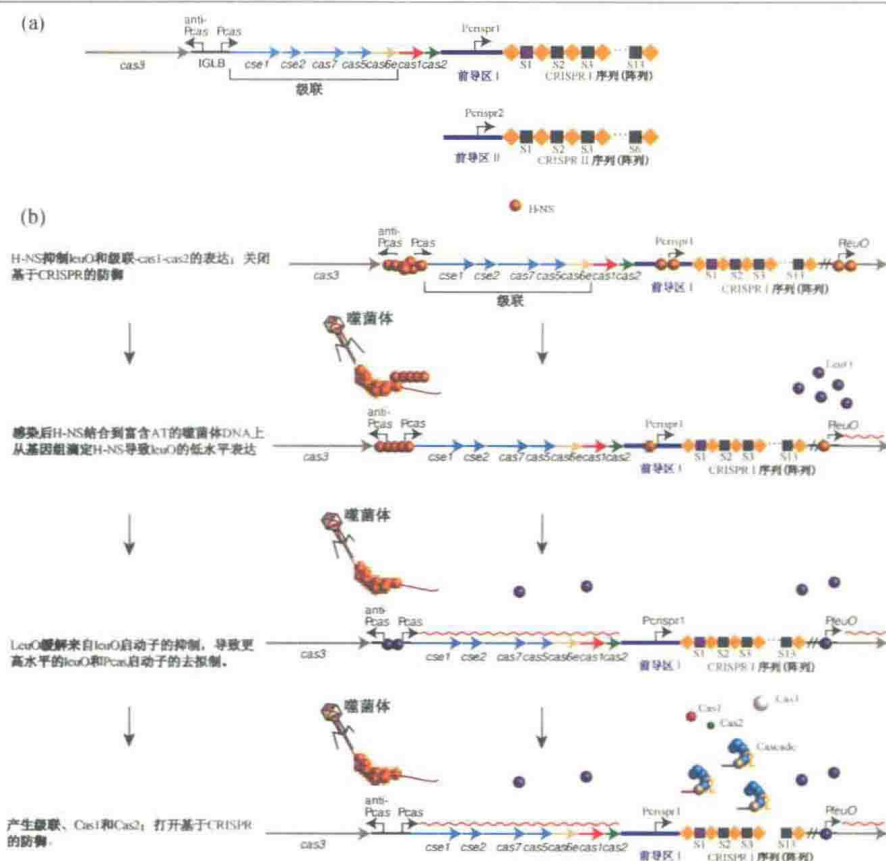


图 4.2

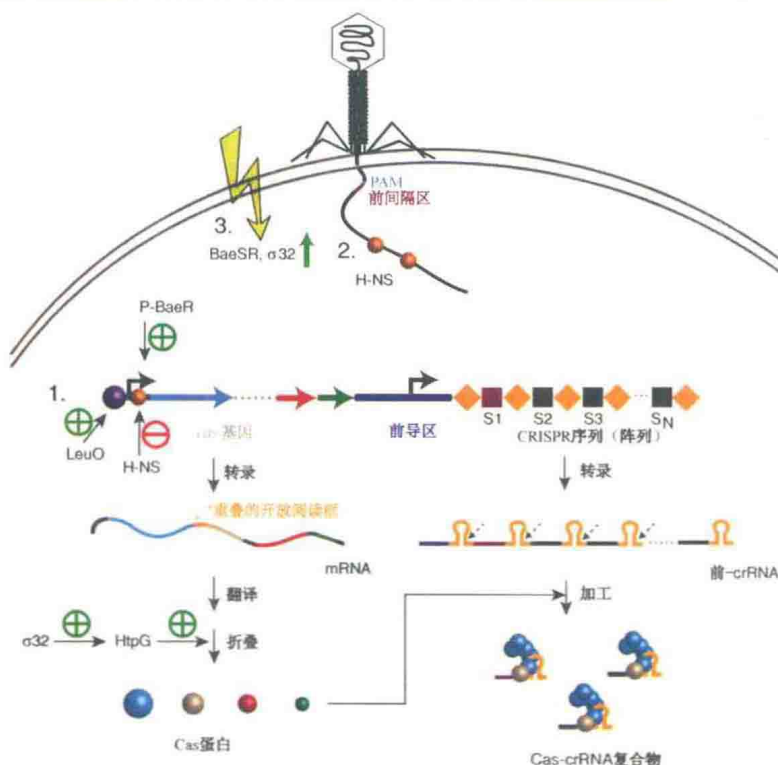


图 4.3